

Title	神経細胞虚血耐性現象の分子機構の解明
Author(s)	野崎, 和彦
Citation	(2003)
Issue Date	2003-05
URL	http://hdl.handle.net/2433/84678
Right	学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。
Type	Research Paper
Textversion	publisher

神経細胞虚血耐性現象の分子機構の解明

課題番号 13470292

平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))

研究成果報告書



平成 15 年 5 月

研究代表者 野崎和彦

(京都大学・医学研究科・講師)

は し が き

研究組織

研究代表者：野崎和彦（京都大学・医学研究科・講師）

研究分担者：橋本信夫（京都大学・医学研究科・教授）

研究分担者：西田栄介（京都大学・理学研究科・教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	8、200	0	8、200
平成14年度	5、700	0	5、700
総計	13、900	0	13、900

研究発表

（1）学会誌等

Nishimura M, Sugino T, Nozaki K, Takagi Y, Hattori I, Hayashi J, Hashimoto N, Moriguchi T, and Nishida E

Activation of p38 kinase in the gerbil hippocampus showing

Ischemic tolerance. J Cereb Blood Flow Metab. (in submission)

Matsuoka N, Nozaki K, Takagi Y, Nishimura M, Hayashi J, Miyatake SI, Hashimoto N.

Adenovirus-mediated gene transfer of fibroblast growth factor-2

- increases BrdU-positive cells after forebrain ischemia in gerbils.
Stroke (in press)
- Hattori I, Takagi Y, Nozaki K, Kondo N, Bai J, Nakamura H, Hashimoto N, Yodoi J.
Hypoxia-ischemia induces thioredoxin expression and nitrotyrosine formation in new-born rat brain. Redox Rep 7:256-9, 2002
- Nozaki K, Nishimura M, Hashimoto N.
Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. Mol Neurobiol 23:1-19, 2001
- Nozaki K, Nishimura M, Hashimoto N.
[Molecular biology of cerebral ischemia] No Shinkei Geka 29:385-91, 2001
- Takagi Y, Nozaki K, Sugino T, Hattori I, Hashimoto N.
Phosphorylation of c-Jun NH(2)-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase after transient forebrain ischemia in mice. Neurosci Lett 294:117-20, 2000
- Sugino T, Nozaki K, Takagi Y, Hattori I, Hashimoto N, Moriguchi T, Nishida E.
Activation of mitogen-activated protein kinases after transient forebrain ischemia in gerbil hippocampus. J Neurosci 20:4506-14, 2000
- Sugino T, Nozaki K, Hashimoto N.
Activation of mitogen-activated protein kinases in gerbil hippocampus with ischemic tolerance induced by 3-nitropropionic acid. Neurosci Lett 278:101-4, 2000
- Sugino T, Nozaki K, Takagi Y, Hattori I, Hashimoto N, Yodoi J.
Expression and distribution of redox regulatory protein, thioredoxin after metabolic impairment by 3-nitropropionic acid in rat brain. Neurosci Lett 275:145-8, 1999
- Sugino T, Nozaki K, Takagi Y, Hashimoto N.
3-Nitropropionic acid induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus in vivo. Neurosci Lett 259:9-12, 1999

(2) 口頭発表

西村真樹：脳梗塞急性期における MAPK cascade の役割、第 27

Matsuoka N, Nozaki K, Hashimoto N

研究の概要と成果

研究目的

脳組織における神経細胞自身の虚血耐性現象の存在が知られており、あらかじめ軽度虚血や spreading depression を付加すると脳神経細胞がその後の虚血負荷に対して耐性を獲得する。当研究者も、レドックス制御について研究をすすめる、脳虚血における TRX/ADF の発現及び TRX/ADF 過剰発現による虚血耐性獲得を証明してきた (J Cereb Blood Flow Metab 18: 206-214, 1998; Neurosci Lett 251: 25-28, 1998; Proc Natl Acad Sci (USA) 96: 4131-4136, 1999)。しかし脳虚血耐性現象の細胞内機構は、今だ解明されていない。最近、MAPK superfamily が真核細胞のストレスならびにアポトーシスのシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、当研究者も培養神経細胞のグルタミン酸毒性によるアポトーシスにおける p38 の関与を証明し (J Biol Chem 272: 18518-18521, 1997)、また、ジャービル海馬遅発性神経細胞死モデルにおいて、p38 の活性化が重要であることを証明してきた (J Neurosci 20: 4506-4514, 2000)。本研究では、これまでの研究成果をさらに発展させ脳虚血における神経細胞の生死を制御する因子を分子レベルで解明し、虚血耐性現象の責任因子を同定することを目的とする。

意義

虚血脳における神経細胞死においては、壊死とアポトーシス両方の関与が示唆されている。この脳組織内における神経細胞死においてこれまでに、オンコジーン、ストレス蛋白、アポトーシス関連遺伝子の発現が報告されてきたが、神経細胞の生死の機構はいまだ不明である。また、虚血耐性現象では本来であれば致死的であるはずの虚血負荷でも神経細胞が保護されることから、従来研究されていた虚血後の神経保護だけではなく、虚血前にあらかじめ神経保護作用をもたらすことが可能となる。本実験では、虚血に対して耐性を獲得した神経細胞内における情報伝達機構を検討し、各磷酸化酵素の相互関係を明らかにすることで、神経細胞の虚血耐性現象の解明の一助とし、さらに臨床における虚血脳の新しい治療の開発の可能性を探るものである。

研究方法

虚血耐性モデルとして、マウス・ジャービル一過性前脳虚血モデル、ラットミトコンドリア神経毒モデル、マウス中大脳動脈閉塞・再環流モデルを用いた。これらのモデルにおいて、虚血後に神経細胞死が起こり、さらに非致死的な虚血負荷により虚血耐性を獲得することを確認した。さらに、耐性を獲得した神経細胞において、immunohistochemistry、Western blotting 法によりカスケードの活性化を検討した。また各リン酸化酵素の阻害剤を用いて、神経細胞死と耐性獲得の変化を検討した。

<虚血耐性モデルの確立>

実験動物として、マウス、ジャービルを用いた。マウス、ジャービルの一過性前脳虚血は、同様に人工呼吸または自発呼吸のもと、一側、または両側総頸動脈一時的遮断により作製した (Neurosci Lett 206: 81-84, 1996; J Neurosci 20: 4506-4514, 2000)。

<MAPK superfamily の活性変化>

上記により作製した虚血耐性モデルにおいて、MAPK superfamily のうち、ERK、JNK、p38 およびその活性化型酵素の時間的、空間的発現変化をimmunohistochemistry、Western blotting により検討し、虚血性神経細胞死、耐性現象に関係する分子を検討した。

<MAPK cascade の活性変化>

同様のモデルにおいて、MAPK の上流に位置する Ras-Raf 系、ASK1 の活性変化、MAPK の下流に位置する転写因子、caspase 系、caspase 系を制御する Akt 系の活性変化を検討し、虚血性神経細胞死、耐性現象における MAPK cascade の関与を検討した。

<MAPK 阻害剤投与実験>

同様のモデルにおいて、各リン酸化酵素の阻害剤を全身または脳室内・組織内投与し、神経細胞の生死、虚血耐性に対する効果を検討し、神経細胞内の MAPK を介するシグナル伝達機構との相関を検討した。

研究結果

脳虚血により MAPK cascade が活性化されることを、ジャービル一過性全脳虚血モデルやラットミトコンドリア神経毒モデル、マウス一過性前脳虚血モデルにおいて確認した (J Neurosci 20:4506-4514, 2000 Neurosci Lett 278:101-

104,2000 Neurosci Lett 294:117-120,2000)。特にジャービルー過性全脳虚血モデルにおいて、海馬 CA1 の遅発性神経細胞死に MAPK family の p38 の関与が大きいことを証明した。次に虚血耐性獲得における MAPK cascade の活性化を検討したところ、ジャービル虚血耐性モデルにおいて p38 が虚血耐性獲得時に活性化されることが、さらに p38 抑制剤により虚血耐性獲得が抑制され、虚血後の神経細胞死が増加することを証明した。またジャービルー過性前脳虚血モデルの海馬において虚血耐性獲得により p38 の活性化のパターンが変動していることを証明した(第27回日本脳卒中学会、仙台、2002年4月25日)。

今後の展望

本研究により、脳虚血耐性獲得において MAPK カスケードが何らかの関わりを持つことが証明された。これは MAPK が脳梗塞治療戦略のターゲットの一つになるばかりではなく、その発現が虚血負荷の程度や、個々の虚血抵抗性にも関与している可能性を示唆している。今後さらに MAPK family(ERK, JNK, p38)の上流や下流の分子や JAK-STAT、PI3 キナーゼ-Akt といった他のカスケードとの相互作用について検討を加えていく予定である。